

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОКОРТИКОСТЕРОИДОВ МЕТОДОМ ЖИДКОСТНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ – ТАНДЕМНОЙ
МАСС–СПЕКТРОМЕТРИИ В ДОПИНГ–КОНТРОЛЕ**

Ю.Г. Походня, В.Э. Сяхович, Е.Н. Галец, Е.В. Дегтеренко, С.А. Беляев

Национальная антидопинговая лаборатория, Беларусь, pohodnia@list.ru

Введение. В современной спортивной медицине препараты глюкокортикоидов нашли применение в качестве мощного противовоспалительного средства для лечения острых и хронических травм мягких тканей и суставов. Также глюкокортикоиды являются по своей природе иммуномодулирующими веществами, обладая значительным иммунодепрессивным эффектом. Они используются для предотвращения развития в организме аутоиммунных расстройств и иных заболеваний, вызванных спортивными травмами и сопровождающимися тканевой ишемией вследствие

краш-синдрома (сдавление от непосредственного удара или последующего сдавления тканей вследствие воспаления и отека тканей). Глюкокортикостероиды благоприятно влияют на спортсменов, поскольку у них в период усиленного тренировочного процесса эпизодически возникают явления тканевой гипоксии и ишемии различной степени выраженности. Применяется как общая и местная, так и очаговая терапия – введение препарата непосредственно в сустав или околосуставные ткани [1].

Однако все глюкокортикостероиды запрещены Всемирным антидопинговым агентством (ВАДА) для приема спортсменами перорально, ректально, при внутривенном и внутримышечном введении в соревновательный период. Кроме того, чтобы проследить потенциальные модели злоупотребления, глюкокортикостероиды включены в программу мониторинга на 2012 год во внесоревновательный период [2].

Национальная антидопинговая лаборатория Республики Беларусь ведет создание методологической базы для определения широкого спектра запрещенных для применения в спорте веществ, в том числе и глюкокортикостероидов. Следует отметить, что для большинства соединений в практике ВАДА допускается использование методик испытаний качественного определения запрещенных препаратов, что связано с их экзогенной природой и отсутствием разрешенной нижней границы содержания этих веществ в организме. В то же время, повышенные требования предъявляются к специфичности разрабатываемых методов. Любой «ложноположительный» результат анализа пробы имеет значительные социальные и психологические последствия для спортсмена, а также может привести к аннулированию лицензии соответствующей антидопинговой лаборатории [3, 4]. В последние годы наблюдается рост интереса аналитиков в допинговом контроле к применению метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ–МС/МС), который обладает не только высокой прецизионностью и низким пределом обнаружения, но и высокой степенью специфичности к определяемым соединениям [5]. В связи с этим, актуальной задачей является разработка на стадии первичного скрининга допинг–проб способа одновременного извлечения из мочи человека различных глюкокортикостероидов и последующего их определения методом ВЭЖХ–МС/МС, который позволит сократить количество «ложноположительных» проб, для которых необходима процедура подтверждения, тем самым снизив временные и материальные затраты на проведение допингового контроля одной пробы. Следует также отметить, что в настоящий момент фармакологическая промышленность выпускает большое количество глюкокортикостероидных препаратов и их различных эфирных форм (более полусотни), которые потенциально могут быть использованы в качестве допинга.

Таким образом, целью проводимых нами исследований являлась разработка методики испытаний качественного определения широкого спектра глюкокортикостероидов методом ВЭЖХ–МС/МС.

Методы. В работе использовали стандартные вещества сравнения глюкокортикостероидов с содержанием основного компонента не менее 99 %: беклометазон дипропионат, бетаметазон ацетат, бетаметазон дипропионат, клобетазон бутират, метилпреднизолон, триамцинолон, флуометазон пивалат были получены от фирмы EDQM Reference Standard (Германия); бетаметазон 17–валерат, дексаметазон 21–ацетат, преднизолон получены от фирмы Ridel–de Haën (Германия); дезоксиметазон, дифлоразон диацетат, флюнизолид, хальцинонид получены от USP Rockville (США); бетаметазон и преднизон получены от Fluka (Германия), а будесонид и флюдрокортизон ацетат от Sigma (США). В качестве внутреннего стандарта использовали метилтестостерон с содержанием 99 % основного компонента фирмы Ridel–de Haën (Германия). Стандартные растворы определяемых соединений (1 мг/мл) готовили растворением навесок в точном объеме метанола. Рабочие растворы получали разбавлением и хранили при температуре –20 °С.

При проведении жидкость–жидкостной экстракции использовали метил–*трет*–бутиловый эфир фирмы Acros Organics (Бельгия), диэтиловый эфир, пентан, этилацетат и диоксан фирмы Sigma–Aldrich (США). Na_2SO_4 , K_2CO_3 , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 фирмы Sigma–Aldrich (США). Основными компонентами буферных растворов при хромато–масс–спектрометрических исследованиях служили ацетонитрил «Lab–Scan» (Польша), и CH_3COOH «Sigma–Aldrich» (США). Все растворы готовили с использованием деионизированной воды Milli Q «Millipore» (Франция) и дополнительно фильтровали с применением системы для фильтрации и дегазации растворителей «Wilmad–LabGlass» (США) через фильтр с регенерированной целлюлозой «Whatman» (Великобритания).

Для приготовления образцов использовалась моча здоровых доноров, заведомо не содержащая исследуемых соединений.

Подготовку образцов осуществляли методом жидкость–жидкостной экстракции метил–*трет*–бутиловым эфиром при значениях pH 10,0 – 10,5 с использованием сульфата натрия в качестве водоотнимающего агента. Предварительно, в каждый образец добавляли метилтестостерон (внутренний стандарт) в конечной концентрации 50 нг/мл, а в контрольные образцы дополнительно вносили стандарты глюкокортикостероидов в концентрации 30 нг/мл. Разрушение глюкуроновых конъюгатов определяемых соединений проводили путем инкубации образцов в течение 70 минут с β –глюкуронидазой E.coli «Roche» (Швейцария) в калий–натрий фосфатном буфере pH 6,4 при 56 °С. Полученные в результате экстракции эфирные вытяжки выпаривали досуха в токе азота, а затем растворяли в 200 мкл хроматографического элюента. Перед вводом в хроматограф все образцы фильтровали с использованием шприцевых фильтров Iso–Disc PTFE–13–2 «Supelco» (США).

Хромато–масс–спектрометрический анализ осуществляли с использованием жидкостного хроматографа Surveyor Plus (Thermo, США) с гибридным масс–спектрометрическим детектором LTQ Orbitrap Discovery (Thermo, США), включающим линейную квадрупольную ловушку. Хроматографическое разделение глюкокортикостероидов проводили на обращено–фазной колонке Thermo Hypersil GOLD (150 × 3,0 мм, Thermo, США). Скорость потока подвижной фазы была постоянной и составляла 0,5 мл/мин. Для хроматографического разделения веществ использовали градиентное элюирование смесью 1 % раствора уксусной кислоты и ацетонитрила, повышая концентрацию ацетонитрила от 5 % до 100 %. Ионизацию образца проводили электрораспылением с использованием источника ESI Ion Max в режиме положительной ионизации в потоке азота 0,45 л/мин с потенциалом на капилляре распыления 5 кВ и температурой на проводящем капилляре источника 350 °С. Детекция проходила в режиме мониторинга селективных реакции. Проводился поиск материнских и дочерних ионов с определенным значением m/z. Данные обрабатывались с применением программного обеспечения Xcalibur (Thermo, США).

Результаты исследования и их обсуждение. Оптимизацию масс–спектрометрических условий для детектирования изучаемых веществ при ионизации электрораспылением с регистрацией положительных ионов проводили непрерывным прямым вводом раствора каждого соединения в масс–спектрометр с использованием встроенного шприцевого насоса со скоростью потока 10 мкл/мин. Глюкокортикостероиды образуют ионы $[M+H]^+$. Оптимизацию условий фрагментации ионов проводили изменяя коллизионную энергию в линейной ловушке. В таблице представлены выбранные характеристичные ионы определяемых веществ для их определения.

Таблица – Относительные времена удерживания (ОВУ), коллизионная энергия (КЭ) и характеристические ионы определяемых глюкокортикостероидов

Определяемое вещество	ОВУ	КЭ*	Характеристические ионы (m/z)				
			Родительский	Дочерние			
Беклометазон дипропионат	1,170	+19	521	503	411	319	–
Бетаметазон 17–валерат	1,065	+17	477	457	355	337	–
Бетаметазон ацетат	0,927	+15	435	415	397	337	–
Бетаметазон	0,805	+15	393	373	355	–	–
Бетаметазон дипропионат	1,134	+17	505	485	411	319	–
Будесонид	0,961	+15	431	395	341	323	307
Дезоксиметазон	0,884	+16	377	357	339	321	–
Дексаметазон 21–ацетат	0,945	+15	435	415	397	–	–
Дифлоразон диацетат	1,020	+16	495	395	317	299	–
Клобетазон бутират	1,191	+17	479	371	343	279	–
Метилпреднизолон	0,799	+16	375	357	339	293	–
Преднизолон	0,739	+15	361	343	325	279	–
Преднизон	0,742	+16	359	341	323	313	–
Триамцинолон	0,665	+16	395	375	357	321	–
Флюдрокортизон ацетат	0,879	+22	423	343	325	307	–
Флюметазон пивалат	1,113	+17	495	477	457	335	–
Флюнизолид	0,852	+19	435	397	339	321	–
Хальцинонид	1,085	+17	455	417	377	359	–

*Примечание – знак «+» указывает на режим ионизации.

В методику скрининг-анализа входили вещества различные по химической структуре, имеющие различные рКа. Поскольку целью работы являлась разработка методики для одновременного определения различных стероидов в одной аликвоте образца, было изучено влияние pH среды на степень экстракции всех соединений. В итоге pH раствора 10,0 – 10,5 был выбран в качестве оптимального для экстракции определяемых веществ. Для одновременного извлечения различных стероидных соединений нами было изучено влияние природы органического экстрагента. В качестве экстрагентов использовали диэтиловый эфир, пентан, метил-*трет*-бутиловый эфир, этилацетат, диоксан и их смеси. Оптимальным экстрагентом для одновременного извлечения всех определяемых соединений из мочи был выбран метил-*трет*-бутиловый эфир.

Практически для всех веществ в оптимизированных условиях степень извлечения определяемых веществ из мочи составила около 50 %, за исключением некоторых соединений: беклометазон дипропионата, бетаметазон дипропионата, клобетазон бутирата и флюметазон пивалата, степень извлечения которых находилась в диапазоне 10–20 %.

При отработанном способе подготовки биологического образца и оптимизированных хроматографических и масс-спектрометрических условиях были определены пределы обнаружения всех изучаемых ксенобиотиков, которые составляли не более 15 нг/мл благодаря высокой чувствительности ВЭЖХ-МС/МС метода в режиме мониторинга селективных реакций, что значительно ниже установленных ВАДА значений минимального требуемого предела обнаружения.

Повторяемость была оценена по результатам повторных анализов шести испытуемых растворов для проверки степени извлечения. Относительное стандартное отклонение (ОСО) отношений площадей пиков шести измерений не превышает 15 % для всех определяемых веществ.

Важнейшей особенностью разработанного нами метода является высокая специфичность определения целевых соединений. В первую очередь, это обеспечивается таким параметром как «относительное время удерживания» определяемого соединения к внутреннему стандарту, значение которого является достаточно постоянной величиной при сохранении основных характеристик хроматографического анализа: колонки, типа элюента, скорости потока, температуры разделения. Разница времен удерживания, полученная при разработке методики определения глюкокортикостероидов, находится в диапазоне от 0,01 до 0,1 %, а относительное стандартное отклонение времени удерживания определяемых веществ, при анализе трёх проб не превышает 0,5 %. В соответствии с требованиями Всемирного антидопингового агентства допустимые отклонения времен удерживания соединения в рефересной и изучаемой пробе не могут превышать 2% либо 0,1 мин, что является довольно жестким ограничением [4]. Вторым параметром, является отношение массы к заряду (m/z) ионов определяемого соединения, фиксируемое масс-спектрометрическим детектором. При этом, учитываются значения m/z как материнского, так и дочерних ионов, образующихся при тандемной масс-спектрометрии (МС/МС) в условиях определенных значений коллизионной энергии, RF частоты, времени воздействия. Эти дочерние ионы, являясь строго специфичными для конкретного соединения и позволяют точно идентифицировать запрещенные вещества.

Разработанная нами методика валидирована в соответствии с СТБ ИСО/МЭК 17025–2007. Произведена оценка таких параметров, как специфичность, чувствительность, стабильность, воспроизводимость.

Выводы. В результате проведенных исследований предложен способ пробоподготовки образцов мочи перед анализом для скрининг-определения глюкокортикостероидов методом ВЭЖХ-МС/МС. Определены степени извлечения всех определяемых веществ. Предел обнаружения глюкокортикостероидов составил не более 15 нг/мл.

Разработанная методика испытаний качественного определения ряда глюкокортикостероидов с оценкой таких параметров как хроматографическое относительное время удерживания и значение m/z материнского и дочерних ионов при тандемной масс-спектрометрии, дает высокую степень специфичности и чувствительности при идентификации рассматриваемых глюкокортикостероидов.

Предлагаемая методика может использоваться как в допинг-контроле, так и в терапевтической практике при контроле за лечением спортсменов и пациентов.

Литература:

1. Фармакология спорта / Горчакова Н.А., Гудикова Я.С., Гунина Л.М. [и др.]; под общ. ред. С.А. Олейника, Л.М. Гуниной, Р.Д. Сейфуллы. – К.: Олимп. л-ра, 2010. – 640 с.
2. WADA Technical Document – The 2012 Prohibited List, January 1, 2012.
3. Всемирный антидопинговый кодекс (World Anti-Doping Code), January 2009.

4. Международный стандарт для лабораторий Всемирного Антидопингового Агентства // International Standard for Laboratories, Version 6.0, January 2012, WADA.

5. A screening method for the detection of synthetic glucocorticosteroids in human urine by liquid chromatography–mass spectrometry based on class–characteristic fragmentation pathways / M. Mazzarino, S. Turi, F. Botrè. Anal. Bioanal. Chem., 2008. – № 390. – P. 1389 – 1402.